

Dres. Fitzner & Christophersen
Rechts- und Patentanwälte
Ratingen - Berlin

Ratingen:

Dr. iur. Ulrich Fitzner
Rechtsanwalt

Patentanmeldung

Dr.-Ing. Dr. iur. Uwe Fitzner
Rechts- und Patentanwalt /European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Ruth Christophersen
Patentanwältin / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Berlin:

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut
Patentanwalt / European Patent Attorney /
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: UNW/DE/972

Datum: 24.05.1997

Anmelder: Prof. Dr. Thomas Hünig, Mittlere Heerbergstr. 26,
D-97078 Würzburg

Titel: Human-CD28 spezifische monoklonale Antikörper zur anti-
genunspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten

Priorität: -----

Beschreibung:

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper, welche für
5 Human-CD28 spezifisch sind und T-Lymphozyten ohne
Besetzung eines Antigenrezeptors der T-Lymphozyten und
somit antigenunspezifisch aktivieren, Hybridomzellen zur
Herstellung solcher Antikörper, ein Verfahren zur
Herstellung solcher Antikörper sowie Verwendungen solcher
10 Antikörper. - Als monoklonale Antikörper sind Antikörper
bezeichnet, die von Hybrid-Zelllinien (sog. Hybridomen)
produziert werden, die durch Fusion einer Antikörper
produzierenden B-Zelle tierischer oder menschlicher
Herkunft mit einer geeigneten Myelom Tumorzelle entstanden
15 sind. Als CD28 wird ein auf T-Lymphozyten menschlicher und
tierischer Herkunft exprimierte Zelloberflächenmolekül
bekannter Aminosäuresequenz bezeichnet, dem im Rahmen der
internationalen "Human Leukocyte Typing Workshops" das
Kürzel CD28 gegeben wurde. Mit Aktivierung von
20 T-Lymphozyten ist die Vermehrung der Stoffwechselak-
tivität, Vergrößerung des Zellvolumens, Synthese
immunologisch wichtiger Moleküle und Eintritt in die
Zellteilung (Proliferation) von T-Lymphozyten auf einen
äußeren Reiz hin gemeint. Beispielsweise werden diese
25 Vorgänge durch Besetzung des CD28-Moleküls auf T-Zellen
durch besondere CD28-spezifische monoklonale Antikörper
ausgelöst. Die Aktivierung von T-Lymphozyten mit den
beschriebenen Begleiterscheinungen ist Teil der
physiologischen Immunreaktion, kann dort aber in
30 pathologischen Situationen außer Kontrolle geraten
(lymphoproliferative Erkrankungen), oder unzureichend sein
(Immundefizienz).

Zum Verständnis der Erfindung ist zunächst folgender technologischer Hintergrund wichtig. Die Aktivierung ruhender T-Zellen zur Proliferation und funktionellen Differenzierung erfordert zunächst die Besetzung zweier 5 Oberflächenstrukturen, sogenannter Rezeptoren: 1. des Antigenrezeptors, der von Zelle zu Zelle eine unterschiedliche Spezifität besitzt und für die Erkennung von Antigenen, z. B. viralen Spaltprodukten, notwendig ist; sowie des auf allen ruhenden T-Zellen gleichermaßen 10 exprimierten CD28 Moleküls, welches natürlicherweise an Liganden auf der Oberfläche anderer Zellen des Immunsystems bindet. Man spricht von der "Kostimulation" der antigenspezifischen Immunreaktion durch CD28. In Zellkultur können diese Vorgänge nachgestellt werden durch 15 Besetzung des Antigenrezeptors sowie des CD28-Moleküls mit geeigneten monoklonalen Antikörpern. Im klassischen System der Kostimulation führt weder die Besetzung des Antigenrezeptors noch die des CD28-Moleküls allein zur T-Zellproliferation, die Besetzung beider Rezeptoren ist 20 jedoch effektiv. Diese Beobachtung wurde an T-Zellen des Menschen, der Maus und der Ratte gemacht.

Monoklonale Antikörper der eingangs genannten Art sind bekannt. Eine "direkte", d. h. von der Besetzung des 25 Antigenrezeptors unabhängige Aktivierung ruhender T-Lymphozyten durch CD28-spezifische monoklonale Antikörper, wurde in folgenden Systemen beobachtet: in der Literaturstelle Brinkmann et.al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106 wurde gezeigt, dass ein sehr kleiner Anteil 30 (5 %) menschlicher T-Lymphozyten, die den für ruhende T-Lymphozyten typischen Oberflächenmarker CD45 RO tragen, durch den "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper 9.3 bei Zusatz des Wachstumsfaktors

Interleukin-2 (IL-2) ohne Besetzung des Antigenrezeptors aktiviert wird. In der Arbeit von Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, wurde gezeigt, dass ein auf konventionellem Wege, d.h. durch Immunisierung von Mäusen mit menschlichen T-Zellen, hergestellter CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper in Zellkultur eine Untergruppe menschlicher T-Zellen ohne Besetzung des Antigenrezeptors zur Proliferation aktivieren kann, wenn CD28 durch diesen monoklonalen Antikörper besetzt wird und die zellgebundenen monoklonale Antikörpermoleküle zusätzlich durch weitere Antikörper miteinander vernetzt werden. In beiden Fällen sind die beschriebenen Antikörper zunächst grundsätzlich nicht zum Einsatz in der Humanmedizin geeignet, da es sich um Maus Antikörper handelt. Weiterhin ist bei den beschriebenen Antikörpern gemeinsam, daß nur ein sehr kleiner Anteil der T-Zellen "direkt" aktivierbar ist.

In der Arbeit von Tacke et al., Eur. J. Immunol., 1997, 27:239-247 wurden zwei Arten von CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpern mit unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften beschrieben: "klassische Antikörper", die die Aktivierung ruhender T-Zellen nur bei gleichzeitiger Besetzung des Antigenrezeptors kostimulieren; und "direkte", die ohne Besetzung des Antigenrezeptors T-Lymphozyten aller Klassen in vitro und im Versuchstier zur Proliferation aktivieren können. Beide insofern bekannte monoklonale Antikörper röhren aus einer Immunisierung mit Zellen, auf denen Ratten-CD28 exprimiert ist und sind durch auf ihre jeweiligen beschriebenen Eigenschaften gerichtete unterschiedlichen Selektionen erhältlich. Ferner wird in dieser Literaturstelle gezeigt, daß CD28-spezifische monoklonale Antikörper, die den direkt aktivierenden Effekt besitzen, viel langsamer als

klassische CD28-spezifische monoklonale Antikörper an
T-Lymphozyten binden; die Bindung an eine
Mausfibroblasten-Zelllinie (L-929), an deren Oberfläche
das CD28-Molekül künstlich durch Transfektion exprimiert
5 wird, erfolgt jedoch für klassische und "direkt"
stimulierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper mit
der gleichen Geschwindigkeit. Daraus wird gefolgert, daß
die insofern bekannten "direkt" stimulierenden
CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper eine aktive Form
10 des CD28-Moleküls erkennen, deren Vorliegen auf ruhenden
T-Zellen durch einen bisher unbekannten Mechanismus
unterdrückt wird, die aber bei Expression des Moleküls in
nicht-T Tumorzelllinien zugänglich ist. Die insofern
bekannten monoklonalen Antikörper sind jedoch einerseits
15 gegen Ratten-CD28 spezifisch und andererseits Maus-
Antikörper. Sie eignen sich daher aus beiden Gründen nicht
für therapeutische Zwecke beim Menschen.

Gegenüber dem Stand der Technik gemäß der beiden
20 erstgenannten Literaturstellen liegt der Erfahrung das
technische Problem zugrunde, "direkte" Human-CD28
spezifische monoklonale Antikörper zur Verfügung zu
stellen, die zum einen auch humanverträglich sind und die
zum anderen Human T-Zellen in breitem Umfang zu aktivieren
25 vermögen.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfahrung
humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für
Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten mehre-
30 rer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigen-
rezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenun-
spezifisch aktivieren, vorzugsweise mit humanen konstanten
Komponenten. - Konstante Komponenten eines Antikörpers

sind Bereiche, die nicht für die Antigenerkennung bedeutsam sind, im Gegensatz zu den variablen Bereichen, die die Antigenspezifität eines Antikörpers definieren. Konstante Komponenten unterscheiden sich jedoch bei Antikörpern verschiedener Arten und folglich auch Tieren und Menschen.

Die konstanten Bereiche eines Antikörpers müssen jenen von Antikörpern eines Organismus entsprechen, der mit den Antikörpern behandelt werden soll, um verträglich zu sein.

Erfindungsgemäße monoklonalen Antikörper sind daher einerseits humanverträglich, sei es per se oder durch Humanisierung und können andererseits zur Behandlung verschiedener Krankheiten, die auf zu geringer T-Lymphozyten-Aktivität beruhen, dienen, da die Antikörper gegen Human-CD28 spezifisch sind und da die Aktivierung der T-Lymphozyten umfassend ist.

Unter die Erfahrung fallen selbstverständlich verschiedenste Derivate von monoklonalen Antikörpern, sofern die beanspruchten Merkmale erfüllt sind. Unter Derivaten von monoklonalen Antikörpern sind Modifikationen des monoklonalen Antikörpers zu verstehen, die durch übliche biochemische oder gentechnische Manipulationen erzeugt wurden. Dies ist beispielsweise gegeben mit der Humanisierung eines monoklonale Antikörpers der Maus durch partiellen Ersatz struktureller (konstanter) Komponenten des Maus-Antikörpers durch solche eines menschlichen.

Im einzelnen sind erfundungsgemäße monoklonale Antikörper erhältlich durch: A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß

Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentechnologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw. Austausch 5 den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen, C) Sezernierung der Antikörper in Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der Antikörper daraus oder Produktion der Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der Antikörper aus 10 der Körperflüssigkeit der Tiere. - Der Kern der Erfindung besteht gegenüber den nächstliegenden Literaturstellen Brinkmann et al., J. Immunology, 1996, 156: 4100-4106, und Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65, demnach in der Erkenntnis, daß eine "direkte" Aktivierung 15 praktisch aller T-Lymphozyten dann erreichbar ist, wenn die monoklonalen Antikörper durch Immunisierung mit nicht-T Tumorzellen, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist, erhalten sind, anstelle einer Immunisierung mit T-Zelllinien. Denn so können monoklonale Antikörper erhalten 20 werden, die nicht nur gegen Human-CD28 spezifisch sind, sondern auch eine "direkte" Aktivierung in beachtlichem Umfang bewirken. Im einzelnen weisen erfindungsgemäß monoklonale Antikörper Spezifität für Determinanten des menschlichen CD28-Moleküls auf, die auf dem natürlicher- 25 weise exprimierten CD28-Molekül schwer zugänglich sind und deren Besetzung durch die neuartigen monoklonale Antikörper zur Aktivierung der T-Zellen führt. Unter einer Determinante ist der Bereich eines Moleküls zu verstehen, der durch die Bindungsspezifität eines oder mehrerer Antikörper- 30 per definiert wird.

Die grundsätzliche Vorgehensweise bei der Herstellung von Hybridomzellen, bei der Humanisierung sowie bei der

Produktion der monoklonalen Antikörper aus (humanisierten) Hybridomzellen ist dem Fachmann gut vertraut und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Grundsätzlich sind alle insbesondere für die Herstellung der Hybridomzellen üblichen, bekannten und frei verfügbaren Zelllinien einsetzbar. Zur Herstellung der monoklonalen Antikörper kommt grundsätzlich neben der folgend beschriebenen Vorgehensweise die dem Fachmann im Detail gut geläufige rekombinante Expression in Frage.

10

Im einzelnen ist es bevorzugt, wenn die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen erhältlich sind durch a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA 15 in den pH β APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen, b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol, c) Kultivierung der in Stufe b 20 erhaltenen transfektierten Zellen, d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen, e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden 25 Maus A20J und/oder L929 Zellen (beispielsweise durch Injektionen 6 x i.p. und anschließend 1 x i.v.), f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit ("nonproducer"-, d.h. keine Antikörper produzierenden) Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels 30 Polyethylenglykol, g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selekterter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen

binden und h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen. Anstelle der Stufen a) bis d) können selbstverständlich aber auch andere dem Fachmann geläufige Expressionssysteme eingesetzt werden. Human-CD28 cDNA ist frei erhältlich von Dr. A. Aruffo und Dr. B. Seed, die die Sequenz und auch folgende Literaturstelle veröffentlicht haben: Aruffo, A., and Seed, B., 1987, "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high efficiency COS cell expression system", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:8573. Dieser Literaturstelle ist daher im einzelnen die Herstellung der Human-CD28 cDNA entnehmbar. Darüberhinaus kann unschwer jeder Fachmann mit Hilfe der in der Genbank deponierten Sequenz und der Polymerasekettenreaktion sehr einfach und schnell einen Human-CD28 cDNA Klon herstellen. Der pH β APr-1-neo Vector ist frei erhältlich von den Autoren der Literaturstelle Gunning, P., et al., 1987, "A human β -actin expression vector system directs high-level accumulation of antisense transcripts", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4831. "neo" steht dabei für Neomycin-Resistenz. Die Stufe c) wird daher in Anwesenheit von Neomycin durchgeführt. Die vorstehend angesprochenen Zelllinien und/oder Mikroorganismen sind frei verfügbar und käuflich erwerbbar bei der American Type Culture Collection (ATCC). Bezuglich Escherichia coli (MC1061) wird ergänzend auf die Literaturstelle Meissner, P.S., et al., 1987, "Bacteriophage gamma cloning system for the construction of directional cDNA libraries", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84:4171, verwiesen.

Gegenstand der Erfindung sind demnach auch gemäß Patentanspruch 4 Hybridomzellen sowie ein Verfahren zur Herstellung von erfindungsgemäßen Antikörpern gemäß der Patentansprüche 5 und 6.

Von eigenständiger Bedeutung ist aber im Rahmen der Erfindung die Verwendung von erfindungsgemäßen monoklonalen Antikörpern zur Herstellung von Arzneimitteln, insbesondere zur Behandlung von Erkrankungen mit pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, wie AIDS oder bei Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen, zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen und/oder zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen. Die galenische Herrichtung der Arzneimittel für die verschiedenen Verabreichungsformen ist dem Fachmann gut bekannt und braucht hier nicht näher erläutert zu werden. Als Qualität der T-Zellreaktion ist insbesondere die Produktion bestimmter Zytokinmuster zu verstehen, die z.B. pro- oder anti-inflammatorisch wirksam sein können oder selektiv zur Produktion bestimmter Immunglobinklassen in B-Lymphozyten führen können (klassische Beispiele für verschiedene Qualitäten der T-Zellreaktion sind die funktionellen TH1 und TH2 Phänotypen, wie in Beispiel 3 beschrieben).

25

Im folgenden wird die Erfindung anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert. In diesen Ausführungsbeispielen werden insbesondere Screeningverfahren im einzelnen präsentiert, mit welchen erfindungsgemäße monoklonale Antikörper bzw. zugrundeliegende Hybridomzellen selektiert werden können. Die Screeningverfahren werden dabei aus Gründen der Einfachheit und zur Demonstration der Verifizierbarkeit an Tiermodellen beschrieben, weshalb mit an

- sich bekannten monoklonalen Antikörpern (JJ 316), welche aus einer Immunisierung mit Ratten-CD28 exprimierenden Zellen herrühren, gearbeitet wird, die aufgrund der Tiermodelle im Gegensatz zu erfindungsgemäßen Antikörpern
- 5 Maus-anti-Ratte Antikörper sind und folglich spezifisch gegen Ratten-CD28 sind. Entsprechende Screeningverfahren lassen sich jedoch für erfindungsgemäße monoklonale Antikörper ohne weiteres durch Austausch der Ratten-CD28 exprimierenden Immunisierungszellen gegen Human-CD28 ex-
- 10 primierende nicht-T-Zellen und ggf. durch Humanisierung auf übliche Weise und auf ganz analogem Wege durchführen. Aus den folgenden Beispielen werden auch erfindungsgemäße therapeutische Einsatzmöglichkeiten deutlich.
- 15 Die dargestellten Experimente wurden im Tiermodell der Ratte durchgeführt, wobei als Beispiel für einen "klassischen" CD28-spezifischen Antikörper der monoklonale Antikörper JJ319 und als Beispiel für einen "direkt" aktivierenden der monoklonale Antikörper JJ316 eingesetzt
- 20 wird. Beide Antikörper sind frei verfügbar und käuflich erwerbar von der Firma Pharmingen, San Diego, USA. JJ319 und JJ316 Antikörper sind im übrigen erhältlich gemäß der Literaturstelle M. Tacke et al., Immunology, 1995, 154: 5121-5127, auf welche hiermit ausdrücklich Bezug genommen
- 25 wird, auch im Hinblick auf übliche Details der Herstellung von Hybridomzellen und monoklonalen Antikörpern.

Beispiel 1.

Fig. 1 zeigt die proliferative Antwort ungetrennter Lymphknotenzellen der Ratte auf den "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonalen Antikörper

(JJ316) und das Ausbleiben einer solchen Antwort bei Einsatz eines "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319). Die Zellen wurden zwei Tage lang in 0,2 ml Medium (RPMI 1640, erhältlich von 5 GIBCO/BRL, enthaltend 5 % FCS [fetal calf serum]) in An- oder Abwesenheit der angegebenen Zusätze bei einer Dichte von 1 Mio. Zellen pro ml im begasten Brutschrank kultiviert. Die Zellteilungsaktivität wurde durch den Einbau radioaktiv markierten Thymidins (1 μ Ci/Ansatz für 10 16 Std., 1Ci = 37GBq, Bestimmung mit β -Detektor) bestimmt.

Im Gegensatz zu veröffentlichten Resultaten (Siefken et al., Cellular Immunology, 1997, 176: 59-65) zeigt dieses Ergebnis, dass es für die T-Zell-Aktivierung durch direkt 15 aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper nicht notwendig ist, diese artifiziell durch einen zweiten Antikörper miteinander zu vernetzen. Vielmehr reicht die Anwesenheit von nicht-T-Zellen aus lymphoiden Organen, nämlich von B-Lymphozyten und sogenannten akzessorischen 20 Zellen, um eine direkte Aktivierung durch löslich zugegebene CD28-spezifische monoklonale Antikörper zu ermöglichen. Wahrscheinlich geschieht dies durch Bindung der monoklonale Antikörper an sogenannte Fc-Rezeptoren dieser nicht-T-Zellen. Dieses Ergebnis ist eine wichtige 25 Voraussetzung für den therapeutischen Einsatz "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonale Antikörper, in dem eine artifizielle Vernetzung mit anti-Immunglobulin Antikörpern im Gesamtorganismus nicht praktikabel ist.

Beispiel 2.

"Direkt" aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper führen zu einer Erhöhung der CD4 T-Zellzahl im intakten Organismus. Fig. 2 zeigt dies für Lymphknoten der Ratte, die am Tag 0 1 mg des "direkt" stimulierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörpers (JJ316) oder des "klassischen" CD28-spezifischen monoklonalen Antikörpers (JJ319) erhalten hatten. Mit erfindungsgemäßen direkt aktivierenden monoklonalen Antikörpern mit Spezifität für Human-CD28, und deren Fähigkeit, die Vermehrung von T-Lymphozyten zu stimulieren, werden ganz analoge Effekte erreicht. Dies kann dann insbesondere in Situationen Anwendung finden, in denen der Anteil von CD4 T-Zellen pathologisch erniedrigt ist und dem Normalniveau wieder angenähert werden soll. Solche Situationen sind insbesondere im Krankheitsbild von AIDS und nach Chemotherapie und Knochenmarkstransplantation gegeben. Im vorliegenden Beispiel ist die CD4 T-Zellzahl nur vorübergehend erhöht; das liegt daran, daß gesunde Tiere mit normalen CD4 T-Zellzahlen behandelt wurden. Die aufgrund der Proliferationsstimulierung "überschüssigen" Zellen werden durch homöostatische Mechanismen abgebaut.

Beispiel 3.

Direkt aktivierende CD28-spezifische monoklonale Antikörper sind therapeutisch einsetzbar, z. B. zur Verhinderung einer inflammatorischen Autoimmunreaktion. Fig. 3 zeigt ein Experiment zur sogenannten Adjuvans Arthritis in der Ratte, einem Modellsystem für bestimmte Formen der rheumatoiden Arthritis beim Menschen. "Paw

"volume increase" gibt die Zunahme des Volumens der Pfoten an. "Days" steht für Tage. "Healthy"-Datenpunkte geben Werte für gesunde Tiere an. Zur Isotyp-Kontrolle wurde ein monoklonaler Antikörper der gleichen Immunglobulinklasse 5 mit Spezifität für ein irrelevantes menschliches Zelloberflächenmolekül verwendet. AA steht für Adjuvans Arthritis. PBS steht für "phosphate buffered saline". W3/25 steht für einen monoklonalen Antikörper mit Spezifität für das CD4 Molekül der Ratte. Die Adjuvans 10 Arthritis wird durch sogenannte TH1-Zellen vermittelt. TH1-Zellen entstehen aus ruhenden CD4 T-Zellen im Verlauf der Aktivierung unter dem Einfluß bestimmter löslicher Faktoren des Immunsystems, sogenannter Zytokine. Die Gegenspieler der TH1-Zellen sind die anti-inflammatoryisch 15 wirkenden TH2-Zellen, deren Entstehung durch andere Zytokine gesteuert wird. Bei dem in Fig. 3 und 4 gezeigten Versuch wurde die Entstehung der Adjuvans Arthritis, abgelesen an der Gelenkschwellung (Fig. 3) und dem arthritischen Index (Fig. 4) nach Immunisierung mit 20 Mykobakterien in Adjuvans, durch den "direkt" aktivierenden CD28-spezifischen monoklonale Antikörper JJ316 fast vollständig unterdrückt. Der "klassische" CD28-spezifische monoklonale Antikörper (JJ319) hatte den gegenteiligen Effekt, d. h. er verschlechterte das 25 Krankheitsbild. Daraus ist erkennbar, auch zur Anwendung beim Menschen, daß durch die Applikation konventioneller bzw. erfindungsgemäßer "direkt" stimulierender CD28-spezifischer monoklonaler Antikörper die Immunreaktion beeinflußt werden kann, hier im Sinne einer 30 "Immundeviation" zu TH1 bzw. TH2. Mit anderen Worten ausgedrückt, können erfindungsgemäße monoklonale Antikörper, aber auch "klassische" monoklonale Antikörper, die für Human-CD28 spezifisch sind (und/oder durch

14

Immunisierung mit T-Zellen erhältlich sind) eine Immunmodulation bewirken. Ein solcher Einsatzzweck "klassischer" monoklonaler Antikörper ist ebenfalls nicht bekannt.

5

Daher betrifft die Erfindung schließlich auch die Verwendung von gegen Human-CD28 spezifischen monoklonalen Antikörpern (erhältlich nach vorstehenden grundsätzlichen Verfahrensweisen, bei Immunisierung mit Human-CD28 exprimierenden T-Zelllinien oder nicht-T-Zelllinien) zur Herstellung von Arzneimitteln zur Modulation von Immunreaktionen, und zwar Immunsuppression (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ319) oder Immunverstärkung (beispielsweise mit Human-CD28 Analogen zu JJ316).

10

20

25

30

Patentansprüche:

1. Humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche für
5 Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-Lymphozyten
mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines
Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit an-
tigenunspezifisch aktivieren.

- 10 2. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1, die erhältlich
sind durch
 - A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen
Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern
15 befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immuni-
nisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf
welchen Human-CD28 exprimiert ist,
 - B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß
Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-
20 Antikörper durch biochemischen oder gentech-
nologischen Austausch konstanter Komponenten
der Tierantikörper gegen analoge konstante Kom-
ponenten eines menschlichen Antikörpers bzw.
Austausch den Komponenten entsprechender Gene
25 der Hybridomzellen,
 - C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in
Hybridomzell-Kulturen und Isolierung der monok-
lonalen Antikörper daraus oder Produktion der
monoklonalen Antikörper durch Injektion der
30 Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse,
und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus
der Körperflüssigkeit der Tiere.

3. Monoklonale Antikörper nach Anspruch 1 oder 2; wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen
5 erhältlich sind durch
- a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH β APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
10 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
15 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
20 f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol,
25 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden und
30 h) Kultivierung/Subclonierung der in Stufe g erhaltenen selektierten Hybridomzellen.

- 4) Hybridomzellen zur Herstellung von monoklonalen Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 3, die durch
5 folgende Verfahrensschritte erhältlich sind:
- a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH β APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
10 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
15 d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
20 f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
25 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 binden.
30

5) Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 mit folgenden Verfahrensstufen:

- 5 A) Herstellung von zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörpern befähigten Hybridomzellen im Wege einer Immunisierung mit nicht-T-Tumorzelllinien, auf welchen Human-CD28 exprimiert ist,
- 10 B) ggf. Humanisierung der aus Hybridomzellen gemäß Stufe A erhältlichen monoklonalen Tier-Antikörper durch biochemischen oder gentech-nologischen Austausch konstanter Komponenten der Tierantikörper gegen analoge konstante Komponenten eines menschlichen Antikörpers bzw.
- 15 C) Austausch den Komponenten entsprechender Gene der Hybridomzellen,
- 20 C) Sezernierung der monoklonalen Antikörper in Hybridomzellen-Kulturen und Isolierung der monoklonalen Antikörper daraus oder Produktion der monoklonalen Antikörper durch Injektion der Hybridomzellen in Tiere, beispielsweise Mäuse, und Isolierung der monoklonalen Antikörper aus der Körperflüssigkeit der Tiere.
- 25
- 6) Verfahren nach Anspruch 5, wobei die zur Produktion von monoklonalen Human-CD28 spezifischen Tier-Antikörper befähigten Hybridomzellen in folgenden Verfahrensstufen hergestellt werden:
- 30 a) Schaffung eines Plasmids mittels Insertion von Human-CD28 cDNA in den pH β APr-1-neo Vector nach Excision des SalI-HindIII Fragments und

- Herstellung von Protoplasten aus Escherichia coli (MC1061), welche das Plasmid tragen,
- 5 b) Fusionierung der Protoplasten mit Maus A20J und/oder L929 Tumorzellen mittels Polyethylenglykol,
- c) Kultivierung der in Stufe b erhaltenen transfektierten Zellen,
- d) Screenen der transfektierten Maus A20J und/oder L929 Zellen auf die Expression von Human-CD28 und Selektion von Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- 10 e) Immunisierung von BALB/c Mäusen mit den Human-CD28 exprimierenden Maus A20J und/oder L929 Zellen,
- f) Entnahme von Milzzellen der so immunisierten Mäuse und Fusionierung der Milzzellen mit Zellen der Zelllinie X63-Ag 8.653 mittels Polyethylenglykol und
- 15 g) Selektierung der so erhaltenen Hybridomzellen mit der Maßgabe, daß im Überstand selektierter Hybridomzellen Antikörper enthalten sind, die an Human-CD28 exprimierende Maus A20J und/oder L929 Zellen binden.
- 20
- 25 7) Verwendung von monoklonalen Antikörpern nach einem der Ansprüche 1 bis 3 zur Herstellung eines Arneimittels zur therapeutischen Behandlung des menschlichen Körpers.
- 30 8) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arneimittels zur Behandlung von Erkrankungen mit

20

pathologisch erniedrigten CD4-T-Zellzahlen, insbesondere AIDS oder nach Stammzelltransplantation nach Chemotherapie von leukämischen Erkrankungen.

5

9) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Potenzierung und/oder qualitativen Beeinflussung von Immunreaktionen bei Schutzimpfungen.

10

10) Verwendung nach Anspruch 7 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Beeinflussung der Qualität der T-Zellreaktion, insbesondere zur Beeinflussung der Produktion verschiedener Effektormoleküle, beispielsweise Zytokine, bei beispielsweise Autoimmunerkrankungen.

15

20

25

30

21

Zusammenfassung

Die Erfindung lehrt humanverträgliche monoklonale Antikörper, welche gegen Human-CD28 spezifisch sind und Human-T-5 Lymphozyten mehrerer bis aller Untergruppen ohne Besetzung eines Antigenrezeptors der Human-T-Lymphozyten und somit antigenunspezifisch aktivieren.

10

15

20

25

30

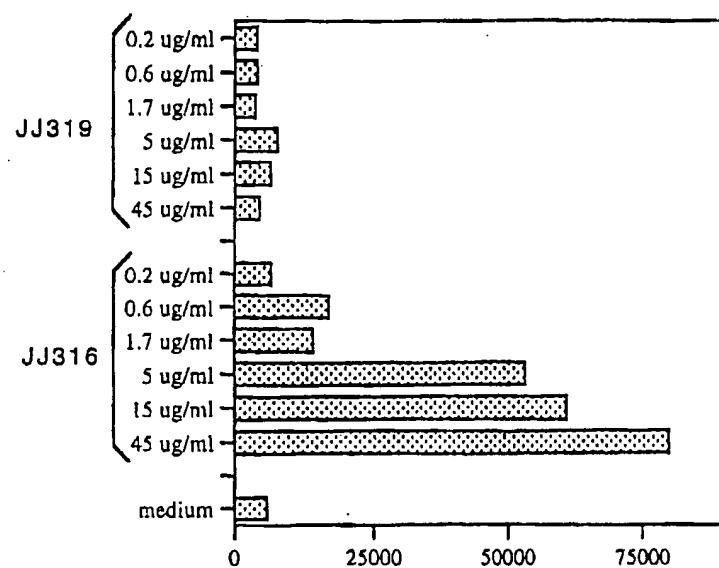


FIG. 1

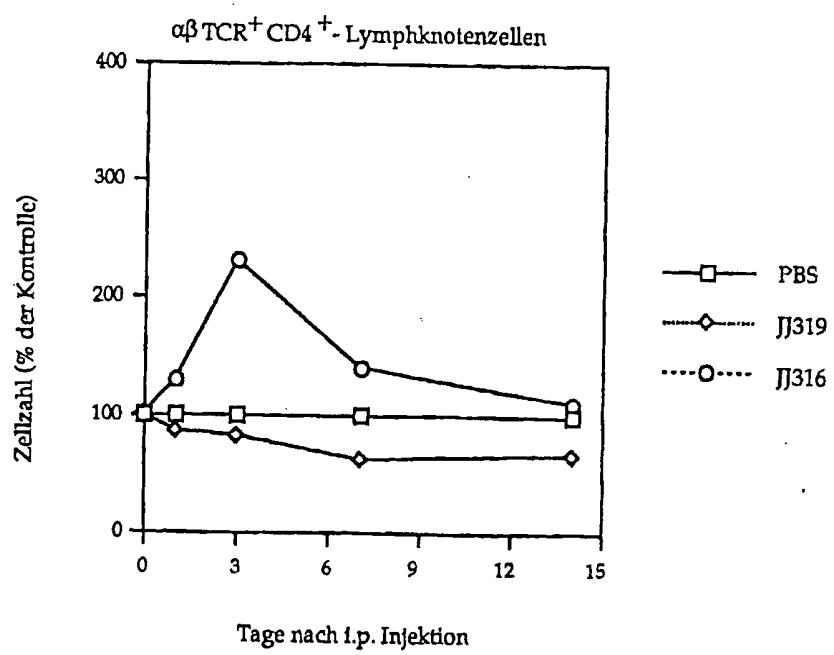


FIG. 2

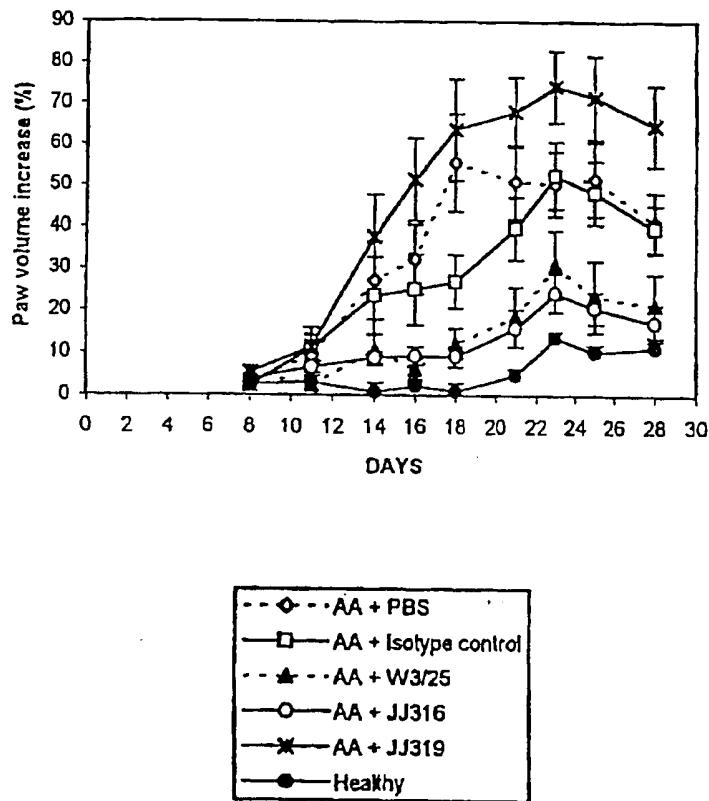


FIG. 3

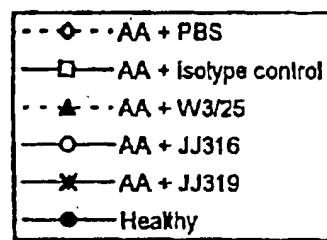
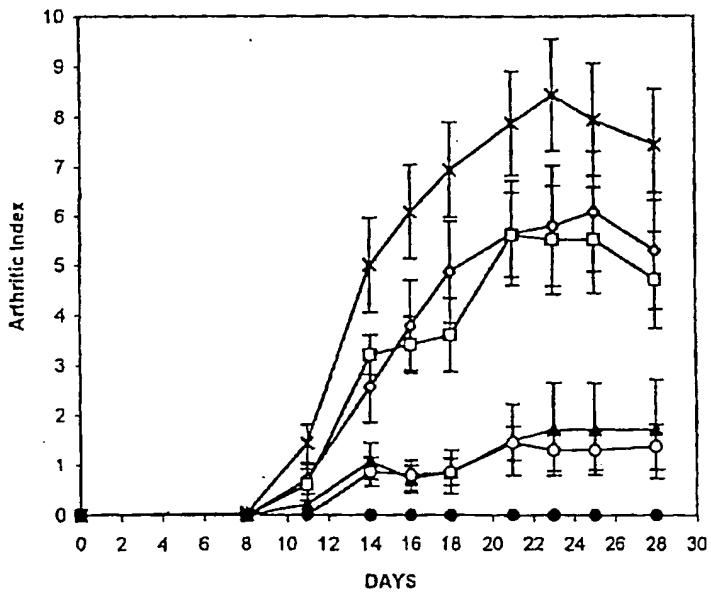


FIG. 4